



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
CAMPUS DIADEMA



THALITA KRISLLEN TEIXEIRA DA SILVA

**Estudo do estímulo da via PI3K/Akt/mTOR promovido
pelo óxido nítrico e possível relação com o
crescimento e proliferação em células de tumor de
mama MDA-MB-231**

DIADEMA

2018

THALITA KRISLLEN TEIXEIRA DA SILVA

**Estudo do estímulo da via PI3K/Akt/mTOR promovido
pelo óxido nítrico e possível relação com o
crescimento e proliferação em células de tumor de
mama MDA-MB-231**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia, ao Instituto
de Ciência Ambientais, Químicas e
Farmacêuticas da Universidade
Federal de São Paulo – Campus
Diadema.

Orientador: Prof. Dr. Hugo
Pequeno Monteiro

DIADEMA

2018

Silva, Thalita Krisllen Teixeira da

Estudo do estímulo da via PI3K/Akt/mTOR promovido pelo óxido nítrico e possível relação com o crescimento e proliferação em células de tumor de mama MDA-MB-231- Diadema, 2018

36 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2018.

Orientador: Dr. Hugo Pequeno Monteiro

Câncer de mama. 2. Triplo negativo. 3. Rapamicina. 4. L-NMMA. 5. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 616.99449

THALITA KRISLLEN TEIXEIRA DA SILVA

**Estudo do estímulo da via PI3K/Akt/mTOR promovido
pelo óxido nítrico e possível relação com o
crescimento e proliferação em células de tumor de
mama MDA-MB-231**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciência Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Aprovado em: 21/06/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro – UNIFESP

Prof. Dr. Fernando Toshio Ogata - UNIP

Prof. Dr. Wagner Luiz Batista - UNIFESP

Dedico esta monografia à minha família que é a personificação de amor, ao meu orientador, a todas as pessoas do laboratório e amigos que tornaram tudo isso possível. Minha eterna gratidão a vocês!

Agradecimentos

Primeiramente quero fazer um triplo agradecimento: aos meus pais e ao meu irmão. O meu tripé e exemplos de profissionais e seres humanos. Papi, obrigada pela paciência, ajudas com softwares e por nunca me negar atenção. Mami, minha vida, obrigada por toda a fé que você tem, pelo amor capaz de me doar e por todos os conselhos. Stephan, obrigada por ser a pessoa mais incrível da minha vida, você é o melhor exemplo de irmão mais velho.

Obrigada Beatriz, por me aconselhar em muitos momentos, me ajudar com as teorias dos experimentos e por me indicar o laboratório de sinalização celular.

Obrigada Karoline e Gabriela por me ensinarem muitas coisas à respeito de congresso, laboratório, teorias de experimentos, etc.

O meu muito obrigada ao Victor, um amigo incrível, que sempre estava disposto a me ajudar, desde situações simples até as mais complexas.

Agradeço à Rita, uma pessoa encantadora, que me fez muitos ensinamentos e me ensinou a dar “os primeiros passos”.

Um “obrigada” é pequeno ao te agradecer Scheilla, minha “mãe científica”, uma pessoa admirável, muito dedicada e responsável, que vibrou nas minhas conquistas e sentiu o que senti nos momentos de desesperos.

Um agradecimento carinhoso à Marli, a rainha do Western Blotting, técnica importante para este trabalho, sem você eu teria feito pouco ou quase nada deste experimento.

Finalmente, quero agradecer ao Prof. Dr. Hugo, homem admirável, respeitoso, um profissional incrível e renomado, obrigada pelos conselhos, ensinamentos, pelo espaço na bancada, pela paciência, pela dedicação e pela maestria com que conduz o seu laboratório, sem você eu não teria conhecido pessoas incríveis, uma linha de pesquisa encantadora e não teria feito um trabalho tão legal, muito obrigada!

"Mesmo quando a vida é difícil ou desafiadora (especialmente quando a vida é difícil e desafiadora), o presente é sempre uma oportunidade para aprendermos, crescermos e nos tornarmos melhores do que jamais fomos antes."

(Hal Elrod)

Resumo

O câncer de mama apresenta, aproximadamente, 1,7 milhões de casos no mundo, sendo 10-20% do subtipo triplo-negativo, neste caso, o seu crescimento não é sustentado pelo fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2/neu) e pelos hormônios estrogênio e progesterona uma vez que não possui receptores para eles, portanto, não responde a tratamentos como terapia direcionadora de receptores Her2 ou hormonal. Novas terapias estão sendo testadas para o tratamento deste subtipo de câncer como é o caso dos inibidores rapamicina e o L-NMMA, que inibem a proteína mTOR e as NO sintases, respectivamente. Estudos têm comprovado a importância do NO para o desenvolvimento do câncer, pois ele ativa a via PI3K/Akt/mTOR que está associada a progressão do tumor para a metástase, esta progressão passa pela transição epitelial-mesenquimal (EMT) em que as células perdem a regulação da adesão devido a repressão transcricional das caderinas, ocludinas e claudinas. O estudo objetiva analisar a expressão e os níveis de fosforilação das proteínas que compõem a via PI3K/Akt/mTOR, caracterizada como a via de crescimento, proliferação e sobrevivência em células do tumor de câncer de mama MDA-MB-231, submetidas ao tratamento com rapamicina e L-NMMA, podendo-se observar desta maneira uma possível influência do NO sobre esta via. Para alcançar os objetivos utilizou-se de: (1) Cultura celular; (2) Determinação dos níveis de NO produzidos pelas células; (3) Técnica de Western Blotting. De um modo geral, todas as proteínas analisadas apresentaram diminuição de expressão e fosforilação na presença dos inibidores, excetuando-se as proteínas Rictor e a Raptor, que, com a diminuição da produção de óxido nítrico (promovida pela utilização de inibidor das NOSs), tiveram seus níveis de expressão e fosforilação (no caso da Rictor) aumentados. Esta observação é interessante e vai de encontro com o baixo potencial invasivo das células quando expostas ao NO e a sua capacidade de manutenção do tamanho celular. A confirmação destes resultados deverá ser acompanhada de mais experimentação que virá com a continuação do estudo. O estudo necessita de aprimoramento, mas sugere que a comprovada proliferação e crescimento celular promovidos pela via PI3K/Akt/mTOR pode ser diminuída se utilizados os dois inibidores.

Palavras-Chave: Câncer de mama. Triplo-negativo. Rapamicina. L-NMMA. Óxido nítrico.

Abstract

Breast cancer accounts for about 1.7 million cases worldwide (according to an International Agency for Cancer, World Health Organization), these cases are approximately 10-20% of the triple-negative subtype (according to National Breast Cancer Foundation) This subtype is characterized by the absence of the Her2/neu, estrogen and progesterone receptors, leading to a non responsive profile through treatments directed to therapy for Her2 or hormonal receptors. New therapies are being tested for this subtype of breast tumor such as the inhibitor of mTOR (Rapamycin) and inhibitor of the NO synthases (L-NMMA). Studies have shown the importance of NO in the development of cancer, because it activates the PI3K / Akt / mTOR pathway that is associated with tumor progression to metastasis through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in which cells loss the regulation of adhesion through the transcriptional repression of cadherins, occludins and claudins. The objective of this study was to analyze the expression of the PI3K / Akt / mTOR pathway, characterized as a growth, proliferation and survival pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells submitted to treatment with rapamycin and L-NMMA to observe a possible influence of NO in this pathway. The materials and methods used were the following: (1) Cell culture; (2) Determination of NO levels produced by cells; (3) Western blotting technique for analysis of PI3K / Akt / mTOR pathway proteins. In general, the proteins analyzed decreased the expression and phosphorylation in the presence of inhibitors, except for the Rictor and Raptor proteins, which had increased expression and phosphorylation levels (in the case of Rictor) and increased expression of Raptor protein according to the decrease in the production of nitric oxide (promoted by the use of NOSs inhibitor). Those observations are intriguing and are related to the low invasive potential of the cells when exposed to NO and their ability to maintain cell size, but the confirmation of these results should be accompanied by new results that will come with the continuation of the study. The study needs improvement, but the results have shown that the tumor progression promoted by the PI3K / Akt / mTOR pathway can potentially be decreased if used the two inhibitors.

Key words: Breast cancer. Triple-negative. Rapamycin. L-NMMA. Nitric oxide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Carcinogênese e metástase	9
1.2 Câncer de Mama	11
1.2.1 Estatísticas e fatores de risco	11
1.2.2 Morfologia e Desenvolvimento dos tumores de mama	12
1.2.3 Classificação dos tumores de mama	13
1.2.4 O câncer de mama do subtipo basal ou triplo negativo	14
1.3 O óxido nítrico e os tumores de mama triplo-negativos	16
1.4 A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR	18
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Cultura celular	22
3.2. Quantificação de NO	23
3.3 Western Blotting	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Determinação dos níveis de NO	24
4.2 Análise por Western Blotting	25
5 Conclusão	30
6 Referências Bibliográficas	31

1- Introdução

1.1 Carcinogênese e metástase

As células normais do corpo naturalmente e ordenadamente crescem, se dividem e morrem. Estes processos ocorrem de forma rápida e linear até que o indivíduo chegue à fase adulta. Na fase adulta a maioria das células passa a se dividir para reparar lesões ou repor células que entraram em apoptose após terem cumprido seu tempo de vida útil (American Cancer Society, 2014).

Modificações no DNA podem dar origem à ativação descontrolada e/ou superexpressão de oncogenes, e/ou a inativação de genes supressores de tumor, acarretando um comprometimento na regulação de processos críticos para manutenção da homeostase celular. A perda desta regulação altera as taxas de replicação, crescimento e diferenciação celulares levando ao desenvolvimento de tumores (Weinberg, 2007).

Os tumores neoplásicos podem ser benignos ou malignos (câncer). A neoplasia benigna tem crescimento lento, organizado, não invasivo e com limites nítidos, o oposto do que ocorre na neoplasia maligna (International Agency for Research on Cancer –IARC, 2016).

Câncer é uma doença que se caracteriza pela proliferação e crescimento celular descontrolados, apresentando perda de diferenciação tecidual. Uma vez transformadas, essas células poderão ativar alguns processos como a angiogênese, que é o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos capilares para obtenção de nutrientes, garantindo as condições apropriadas para o seu desenvolvimento. A ocorrência de metástases é caracterizada quando as células tumorais se destacam do tumor primário, adquirindo capacidade de migrar e invadir o estroma adjacente e o sistema circulatório (Figura 1). Além da capacidade de sobreviver na circulação sistêmica e de readesão no tecido alvo as células devem reestabelecer o estado de proliferação descontrolada. Neste contexto, denominam-se tumores malignos àqueles capazes de infiltrar a membrana basal, atingir sistemas de circulação e migrar para outros tecidos, estabelecendo-se a metástase. (Cooper, G. e Hausman, 2007; Weinberg, 2007).

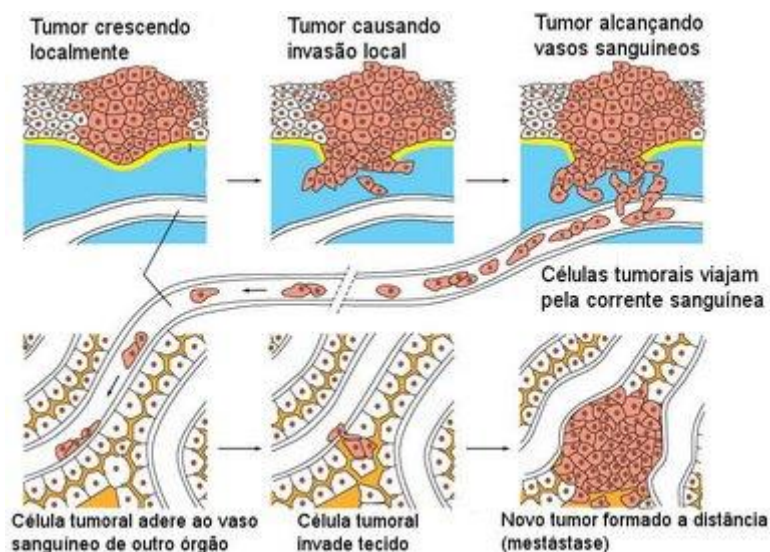


Figura 1 – Etapas do processo metastático, no qual as células tumorais destacam-se do sítio primário, passam pela transição epitélio-mesenquimal e tornam-se capazes de infiltrar a membrana basal e vascular. (Alberts B., *et. al.*, 2010).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo que acontece durante a progressão do tumor e a metástase é um fenômeno no qual as células epiteliais se desprendem da membrana basal. Nas últimas décadas foi definido que a EMT desempenha papéis críticos na morfogênese embrionária, como a transdiferenciação, conduzido por fatores de transcrição, permitindo que as células do fenótipo epitelial gerem derivados mesenquimais. Ao adquirirem um fenótipo mesenquimal se assemelham a fibroblastos e as células tumorais deixam de ser polarizadas, diminuindo as junções/interações célula-célula. A EMT é reversível, as células que assumiram um fenótipo mesenquimal podem reverter para um estado epitelial através da transição mesenquimal-epitelial (MET) que é importante na adesão das células tumorais que migraram para o sítio de metástase (Christine, 2011).

Uma das principais classes de proteínas envolvidas no desenvolvimento embrionário é a família das caderinas. As E-caderinas (caderinas tipo I) são glicoproteínas transmembranares que medeiam a adesão célula-célula. A existência de E-caderina foi primeiro proposta no final da década de 1970 e logo foi considerado um importante mediador de adesão celular, pois conecta-se a microfilamentos de actina via α -catenina e β -catenina (Figura 2) formando junções estáveis (Gheldof, 2013).

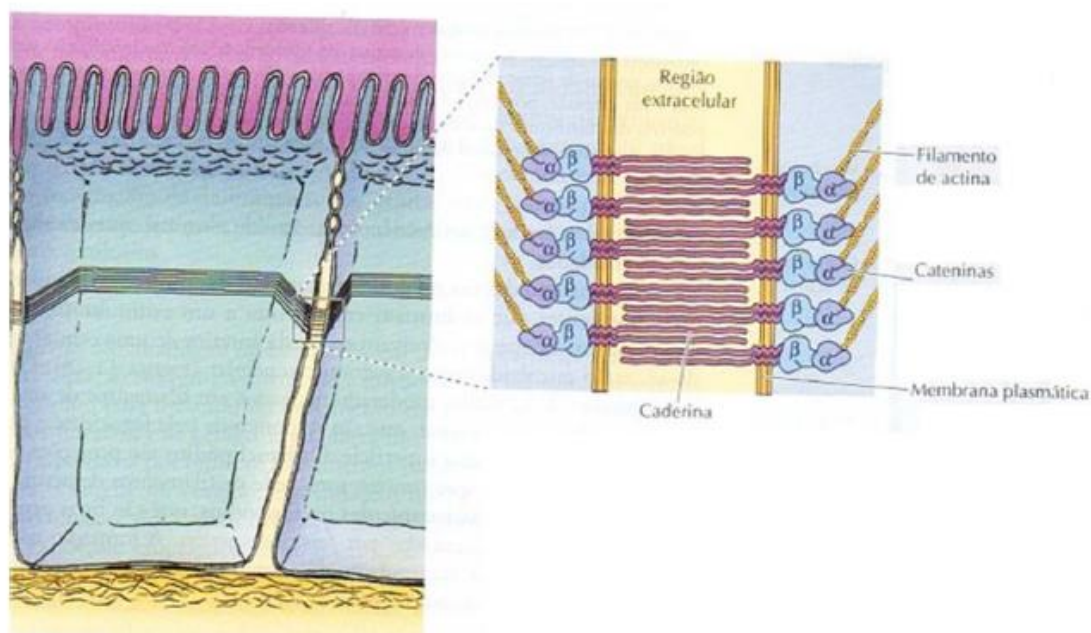


Figura 2 – Formação de junções aderentes pelo complexo formado por caderinas e cateninas ligadas à filamentos de actina celulares essencial para morfologia do tecido epitelial. (Cooper, G. e Hausman, 2007).

1.2 Câncer de Mama

1.2.1 Estatísticas e fatores de risco

O câncer de mama está entre os de maior incidência mundial, representando 25% do total de casos de câncer, com aproximadamente 1,7 milhão de casos novos em 2012, sendo o maior causador de mortes entre as mulheres, segunda causa de morte por câncer em países desenvolvidos e a quinta causa de morte por câncer no mundo (contabilizaram 522 mil mortes para o mesmo ano). É previsto que a incidência de câncer de mama, no mundo, chegará a aproximadamente 3,2 milhões de novos casos por ano até 2050 (Instituto Nacional do Câncer- INCA, 2016).

No Brasil, foram estimados 57.960 novos casos, para 2016-2017, o que indica uma taxa de incidência de 56,2 casos para 100.000 mulheres e, apesar das tecnologias contribuírem muito para o diagnóstico de câncer de mama no início e, desta forma, promover melhorias no prognóstico da doença, as taxas de mortalidade ainda estão muito altas. A taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população mundial é de 13,03 mortes por 100.000 mulheres, representando a primeira causa de morte por câncer na população

feminina brasileira em 2014, para o mesmo ano esta taxa foi de 14,60 e 14,21 mortes a cada 100.000 mulheres nas regiões Sul e Sudeste, respectivamente, posicionando-as como de maior mortalidade do país (INCA, 2014).

Acredita-se que a incidência deste tipo de câncer aumentará ainda mais em países menos desenvolvidos, devido ao estilo de vida muito associado a fatores de risco. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama podem ser divididos em fatores: (1) Hereditários que são representados pela herança genética propícia ao desenvolvimento desta doença; (2) Hormonais que podem se manifestar através da idade de menarca e menopausa, paridade e nuliparidade, idade da mãe ao nascimento do primogênito, terapia de reposição hormonal e uso prolongado de anticoncepcional; (3) Externos representados pelo número de biópsias, exposição à radiação ionizante, sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, sobrepeso, etc. (CDC, 2018).

1.2.2 Morfologia e Desenvolvimento dos tumores de mama

O câncer de mama ocorre, em sua maioria, em mulheres, porém homens também podem ser acometidos por esta doença. A mama feminina é composta principalmente de lóbulos, ductos e estroma (Figura 3). Os lóbulos são glândulas capazes de produzirem leite, os ductos o transportam e o estroma é o tecido adiposo conectivo em que as outras estruturas estão localizadas. No estroma ainda estão presentes os vasos sanguíneos e linfáticos; Os primeiros são representados por artérias e veias e são responsáveis pelo transporte de glóbulos brancos e vermelhos, plasma e plaquetas do tecido mamário para o corpo e do corpo para a mama; Os vasos linfáticos transportam a linfa (líquido composto de resíduos, fluidos e células do sistema imune, incluindo os linfonodos que tem importante relação com a metástase) das mamas para o corpo (American Cancer Society, 2007).

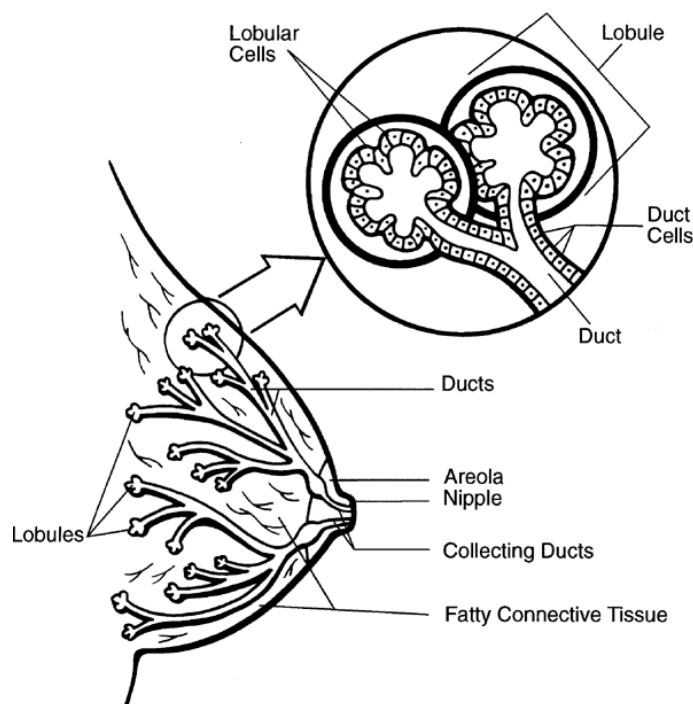


Figura 3 – Estruturas de composição das mamas femininas. (American Cancer Society, 2007).

A maioria dos nódulos encontrados nas mamas são tumores benignos, mas necessitam de biopsia, pois algumas condições como papilomas e hiperplasia atípica, podem fornecer à mulher maior risco de desenvolver este câncer. Muitos passam a ser alterações fibrocísticas que podem causar dores e inchaço (American Cancer Society, 2007).

O câncer de mama na maioria dos casos, se inicia nas células que revestem os ductos. Em alguns casos os tumores se iniciam nas células constituintes dos lóbulos. As células tumorais podem invadir os vasos linfáticos e crescerem nos linfonodos, desta forma se espalham para gânglios linfáticos e possuem uma maior probabilidade de penetrarem a corrente sanguínea e metastatizar. Essas características estando bem definidas auxiliam na escolha do tratamento (American Cancer Society, 2007).

1.2.3 Classificação dos tumores de mama

Em 2012, a OMS estimou 20 subtipos na classificação para tumores de mama, tratando-se de uma doença heterogênea, apresentando um espectro variado de características clínicas, patológicas e moleculares. Foram

estabelecidos para essa doença diferentes prognósticos relacionados à malignidade e conseqüentemente escolha de terapias (INCA, 2012).

Quanto às características moleculares a divisão em subtipos é baseada em marcadores biológicos e fenotípicos. Um painel imunohistoquímico padrão (IHC) para a expressão celular de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2) pode subdividir o câncer de mama em quatro subtipos. (Onitilo *et al.*, 2009). Existem dois subtipos de tumores de mama ER positivos e dois ER negativos (Tabela1) (Gierach L.G., 2010).

Tabela 1 – Subtipos do câncer de mama, caracterizados a partir de seus principais marcadores biomoleculares. (Gierach L.G., 2010).

Subtipo de câncer de mama	ER	PR	HER2	Tripla designação
Luminal A	+	±	–	ER+PR±HER2–
Luminal B	+	±	+	ER+PR±HER2+
HER2	–	–	+	ER–PR–HER2+
basal ou triplo- negativo	–	–	–	ER–PR–HER2–

1.2.4 O câncer de mama do Subtipo basal ou triplo negativo

O subtipo basal representa de 10 – 20 % do total de casos de câncer de mama no mundo (OMS, 2016).

Alguns estudos afirmam que, por motivos ainda desconhecidos, mulheres afro-americanas são mais propensas a desenvolverem este subtipo de câncer e possuem menos de 40 anos (período anterior à menopausa), além disso é mais comum em mulheres com menarca precoce, primeira gravidez antes dos 26 anos e que possuem relação cintura-quadril aumentada. A multiparidade promove um maior risco de desenvolvê-lo pós-menopausa. (Katrina, 2007; Yang, 2007; Millikan, 2008. Revisado por Toft e Cryns, 2011)

O câncer de mama triplo negativo (TNBC), como mencionado anteriormente, não apresenta nenhum dos três principais marcadores biomoleculares para este tipo de tumor, caracterizando-o como o subtipo mais agressivo e de pior prognóstico. As mulheres portadoras deste tipo de tumor não obtêm uma resposta completa às terapias conhecidas até o momento, assim há risco de recidiva em um período entre dois e cinco anos após o tratamento, resultando em uma taxa de sobrevida menor do que cinco anos (Bauer, 2007; Dent, R., 2007).

O TNBC possui como principais alvos da metástases distal os pulmões, fígado e sistema nervoso central, este último apresenta uma frequência de 6,7% a 9,6% de todos os casos metastásicos e sobrevida média menor do que cinco meses a partir do diagnóstico (Dawood, 2009).

A resistência deste tumor a apoptose está associada à expressão do receptor tirosina quinase para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) que confere resistência à apoptose por ativação da via PI3K / Akt / mTOR (mais sobre esta via na seção 1.4), além disso este subtipo de tumor expressa a chaperona B-cristalina, que suprime a apoptose inibindo a ativação da caspase-3 (Moyano, 2006. Revisado por Toft e Cryns, 2011).

A proliferação celular se relaciona diretamente à progressão através do ciclo celular da fase G1 para a fase S, esta transição no ciclo é regulada negativamente pelo gene supressor de tumor RB. A entrada na fase S ocorre pela indução da expressão da ciclina E (que está em maior número nos tumores triplo-negativos do que em outros subtipos de tumores de mama) ocasionada pela liberação de fatores de transcrição da família E2F, desregulando a via de RB (Toft e Cryns, 2011; Agarwal, 2009).

Alguns estudos sugerem que o caráter altamente proliferativo deste subtipo de câncer de mama relaciona-se à perda de RB e / ou superexpressão de ciclina E e expressão de EGFR, com consequente ativação de vias proliferativas. (Livasy, 2006; Voduc, 2008).

1.3 O óxido nítrico e os tumores de mama triplo-negativos

O óxido nítrico (NO) é um radical livre muito importante para diversas funções celulares como a sinalizadora nos sistemas cardiovascular, neural e imunológico, devido à sua capacidade de se difundir em membranas plasmáticas possibilitada pela sua apolaridade. O NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel com produção do segundo mensageiro Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato (cGMP) que irá iniciar processos de sinalização celular. NO também modifica proteínas através da s-nitrosilação, a reação deste com o grupo SH do aminoácido cisteína de proteínas, sinalizadoras ou estruturais, desencadeia processos de sinalização celular (revisado por Monteiro, *et al.* 2015).

As propriedades bioquímicas do NO determinam os efeitos biológicos influenciados por ele, por exemplo, seu caráter lipofílico lhe confere capacidade de se difundir através das membranas celulares promovendo efeitos biológicos como alterações na pressão sanguínea e transmissão neuronal. Ele exerce ações citoprotetoras ou citotóxicas, dependendo da sua concentração, origem (endógena ou exógena), compartimento em que está localizado e sensibilidade da célula em questão. A proliferação, a migração e a progressão tumoral são resultados de baixas concentrações de NO, já os efeitos citostáticos e citotóxicos estão relacionados às altas concentrações do radical (Fukumura *et al.*, 2006; revisado por Monteiro *et al.*, 2015; Tavares *et al.* 2017).

A produção endógena de NO é catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. As NOS possuem 3 isoformas: a nNOS que faz parte da modulação da informação neural e de neurotransmissores e a eNOS a qual participa da alteração da pressão sanguínea. A nNOS e a eNOS quando expressas constitutivamente dependem de Ca²⁺-calmodulina, apresentando baixos fluxos de NO e, por isso, estão associadas à citoproteção e proliferação celular. A iNOS é a NOS induzida em células do sistema imunológico, como nos macrófagos, por citocinas e lipopolissacarídeos. Quando comparada às outras enzimas constitutivas a iNOS tem uma produção maior de NO (Förstermann e Sessa, 2012).

Os tumores podem expressar em diferentes níveis as três isoformas de NOS, em vários tipos de tumores a expressão da iNOS está correlacionada

com um prognóstico ruim para os portadores destes tumores (Lechner, 2005. De Oliveira *et al.*, 2017), isto ressalta o quanto esta enzima é importante para o desenvolvimento tumoral. Estudos mostram tanto em modelos *in vitro* quanto em modelos *in vivo* que a iNOS induz a carcinogênese e a progressão do tumor, estimulando a angiogênese, e favorecendo a progressão do tumor à metástase (Esther L, 2014). Além disso, a expressão da iNOS promove o crescimento celular e a capacidade de invasão de células de tumor de cólon e mama (Thomas e Wink, 2017). Inibidores podem regular negativamente a atividade da iNOS, como é o caso da aminoguanidina (AG). Estudos mais recentes mostraram que o uso de outros inibidores da iNOS, 1400W que é específico para esta isoforma e L-NMMA que é um inibidor mais geral das NOSs, resultou em inibição de crescimento de tumores de cólon e de mama do subtipo triplo negativo, respectivamente (Granados-Principal *et al.* 2015; Puglisi *et al.*, 2015).

Níveis relativamente elevados de NO estão presentes em muitos tipos de tumores humanos, como os tumores de mama, cérebro, pulmão, próstata, entre outros. No entanto, estudos em nódulos linfáticos, metástases subcutâneas e até mesmo em câncer de mama humano mostram que pacientes que apresentam baixos níveis de expressão de iNOS possuem uma maior probabilidade de desenvolverem metástase distal (Thomas e Wink, 2017).

As diferentes formas de participação do NO nos tumores estão supostamente associadas com a compartimentalização da iNOS nos tecidos e nas células tumorais, variações nos níveis intracelulares de NO, expressão de genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, e potencial de ativação de vias de sinalização associadas à progressão tumoral e operantes nas células tumorais (Monteiro *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.* 2017).

Os tumores de mama triplo-negativos expressam a iNOS e esta expressão está associada a um prognóstico negativo para as portadoras, (Glynn *et al.* 2010; Basudhar *et al.*, 2017).

Outros estudos também demonstraram que a iNOS pode induzir um acúmulo de mutações no oncogene p53, aumentando a expressão do gene de transativação do receptor do EGFR via s-nitrosilação, contribuindo para

metástase distal, ativação de vias de proliferação (como a PI3K/Akt/mTOR) e diminuição da sobrevida (Garrido P., *et al.* , 2017).

As células MDA-MB-231 são modelos celulares utilizados amplamente no estudo do câncer de mama do subtipo triplo negativo. Nas células MDA-MB-231 a via PI3K/AKT/mTOR se encontra ativada e está associada à sobrevivência aumentada destas células (Toft e Cryns, 2011).

1.4 A via de sinalização celular PI3K/Akt/mTOR

Estudos demonstraram que o micro-RNA miR-21 regula a expressão de vários genes relacionados à progressão de tumores, sugere-se que ele também exerça seu efeito sobre PTEN, uma fosfatase lipídica que regula a ativação de PI3K e também participa da supressão de tumores, esta proteína sofre regulação negativa em muitos tipos de cânceres de mama, supostamente devido à regulação positiva de miR-21, desta forma, a via PI3K/Akt/mTOR é estimulada (Huang, *et al.* 2009; Yan, *et al.* 2008).

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é ativada em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, a partir da ligação à um receptor tirosina quinase, por exemplo, EGFR ou receptores de insulina e insulina-símile (Figura 4). As vias de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR constituem as vias de sinalização mais bem estudadas em resposta a ativação do EGFR, de receptores de insulina e insulina-símile, estas vias regulam processos de proliferação, sobrevivência e metabolismo de células normais e têm um papel importante na tumorigênese (Toft e Cryns, 2011).

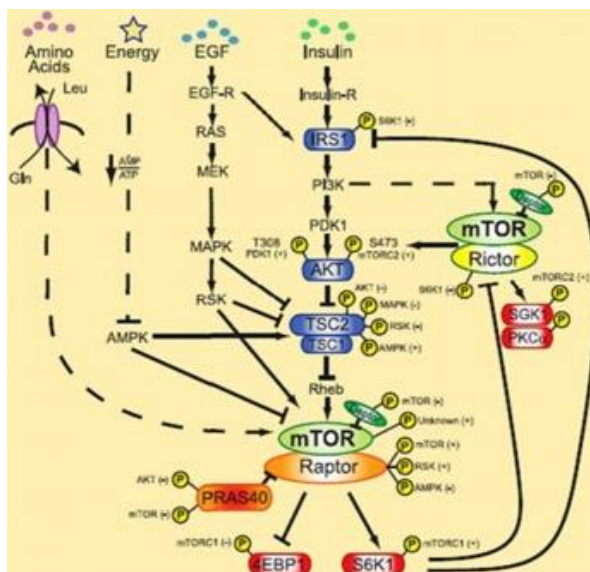


Figura 4- Esquema das vias de sinalização ativadas por receptores tirosina quinase associados ao crescimento e sobrevivência celular (modificado de FOSTER, K. G. *et al*, 2010).

Proteínas Serina/Treonina quinases como Akt e mTOR são quinases multifuncionais ativadas tardiamente que funcionam como mediadores centrais da via (Foster e Fingar, 2010).

A proteína mTOR forma dois complexos distintos, mTORC1 e mTORC2, com multisubunidades, que possuem atividades diferentes e complementares. O complexo mTORC1 é formado pela proteína Raptor, proteína reguladora associada à mTOR (do inglês, regulatory-associated protein of mTOR) e controla o crescimento celular e sobrevivência, ativa a proteína quinase S6K1 e inibe 4EBP1, promovendo tradução de mRNAs, influenciando diretamente no crescimento celular. Esse complexo é ativado por fatores de crescimento, nutrientes, sinais de energia e estresse celular. (Foster e Fingar, 2010; Zoncu, 2011; Aylett *et al*. 2016). No complexo 2 a proteína mTOR está associada com a proteína Rictor (do inglês, rapamycin-insensitive companion of mTOR). O complexo mTORC2 é insensível a sinais dependentes de nutrientes e energia, ele ativa a proteína quinase C-α (PKC-α) e a proteína Akt e tem papel na regulação de actina no citoesqueleto e sobrevivência celular (Figura 5) (Aylett *et al*. 2016).

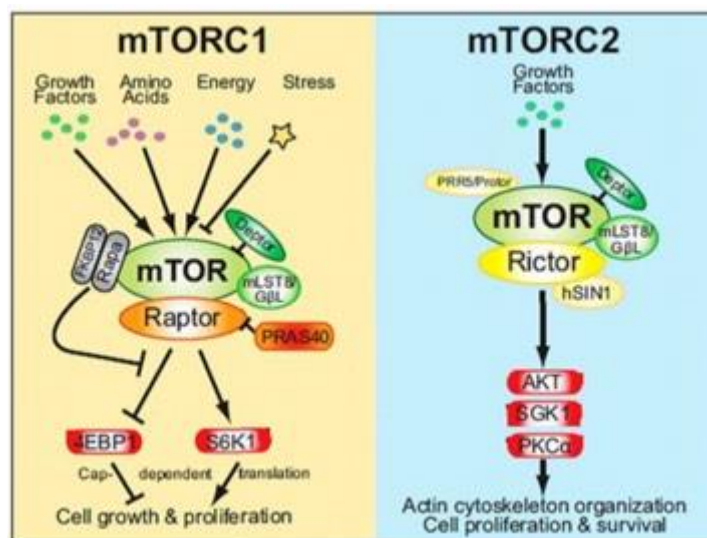


Figura 5 – Complexos mTORC1 e 2 e proteínas associadas à mediação de processos celulares por esses complexos (modificado de FOSTER, K. G. *et al*, 2010).

Alguns estudos recentes mostraram a dependência da expressão e ativação de iNOS para modular a atividade de mTOR em melanoma humano, isto ocorre por meio do NO e modificações pós-tradução de TSC2, evidenciando que esta via é alvo do NO e da iNOS (Esther L *et al.*, 2014).

Alterações nesta via de sinalização, seja por elevação nos níveis de expressão ou mutação de PI3K, perda da função de PTEN ou superexpressão de Akt, mTOR e p70S6K, são comuns em vários tipos de tumores, e desempenham um papel importante na sua progressão (Yuan, T L. e Cantley, L C. 2008; revisado por ZONCU, R. 2011).

Por ser uma proteína quinase que participa de conexões com várias vias de sinalização, a inibição da mTOR é considerada um bom alvo para terapias de um grande número de tumores (Korets *et al.* 2011; Fokas *et al.*, 2011; Nogueira *et al.*, 2011; Steelman *et al.*, 2011).

A rapamicina é um agente antimicrobiano inicialmente usado para induzir imunossupressão. Ele forma um heterodímero com FKBP12 (FK506 binding protein rapamycin) liga-se à mTOR inibindo-a (Wullschleger *et al.* 2006). Em concentrações baixas (10-50 nM) a rapamicina é capaz de inibir apenas o complexo mTORC1, enquanto em concentrações elevadas (150-200 nM) os dois complexos, mTORC1 e mTORC2, são inibidos (Gulhati P, 2009).

Estudos prévios, realizados no laboratório onde está se desenvolvendo este trabalho, mostraram para a linhagem de tumor de cólon humano SW620, obtida de metástase em linfonodos de células de tumores primários de cólon SW480, uma diminuição nos níveis de fosforilação da mTOR, após tratamento com concentrações crescentes de rapamicina (Figura 6).

Neste mesmo estudo também foi observado que a rapamicina inibia a expressão da iNOS que era estimulada nas células que se encontravam sob restrição de nutrientes (Figura 7).

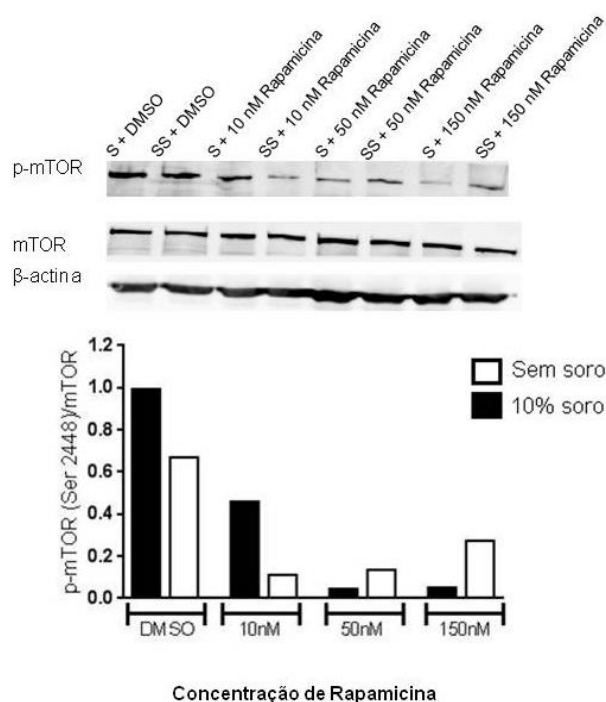


Figura 6 – Inibição dos níveis de fosforilação da mTOR na presença de rapamicina em células de tumor de cólon humano SW620 submetidas ou não a restrição de nutrientes. – Os níveis de expressão e de fosforilação da mTOR foram analisados por Western Blotting. (Reproduzido de Talita Y. Leite- Relatório de Atividades Iniciação Científica 2014).

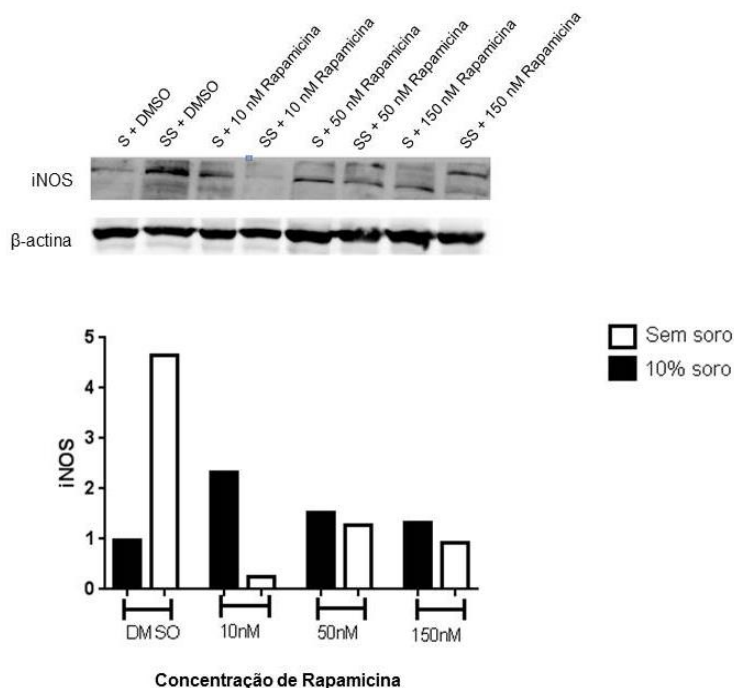


Figura 7 – Modulação dos níveis de expressão da iNOS em células de tumor de cólon humano SW620 submetidas ou não a restrição de nutrientes e incubadas com concentrações crescentes de rapamicina – Os níveis de expressão da iNOS foram analisados por Western Blotting. (Reproduzido de Talita Y. Leite- Relatório de Atividades Iniciação Científica 2014).

Embora este estudo comentado acima tenha abordado células de tumor de cólon SW620, os resultados obtidos nos levaram a investigar se a relação entre a produção endógena de NO e a ativação da mTOR também aconteceria em células da linhagem de tumores de mama triplo negativos, MDA-MB-231. Neste sentido, o presente estudo busca entender a relação do NO e da rapamicina com a via de crescimento, proliferação e sobrevivência celular PI3K/Akt/mTOR.

2- Objetivos

- Analisar a influência do NO na via de sinalização PI3K/Akt/mTOR;
- Avaliar os efeitos da rapamicina e do L-NMMA na via.

3- Materiais e métodos

3.1 Cultura celular

Células tumorais de linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. Foram

mantidas em estufa com 5% CO₂ à 37°C, sendo que, foram feitas tripsinização e trocas do meio duas vezes por semana.

3.2 Quantificação de NO

Determinação dos níveis de NO produzidos pelas células na ausência e na presença de nutrientes - Para os experimentos de quantificação do nitrito, um dos produtos de oxidação do NO, NOx, 5x10⁵ células foram semeadas em placas de 6 poços na presença de 10% SFB por 24 h para adesão. Após este período, foram adicionados 2 mL de meio sem soro e as células foram mantidas em estufa por 4, 8, 16, 24 e 48 h. Após cada período de incubação, foram coletadas alíquotas do sobrenadante para análise de nitrito e nitrato. A quantificação de NOx presente em uma amostra foi feita por quimioluminescência, usando o analisador de NO (NOA, Sievers). As amostras são adicionadas a uma câmara de reação contendo uma solução saturada de cloreto de vanádio (III) (VCl₃) em HCl (1,0 M), mantidas a 90°C e purgadas continuamente com N₂. O nitrogênio carrega o NO formado pela reação de nitrito/nitrato com o VCl₃ a uma solução de NaOH, que retém o gás cloro e, depois a uma câmara de ozônio (O₃), a -18°C, na qual ocorre a reação de quimioluminescência. Esta reação tem a participação do NO reagindo com O₃ formando *NO₂ (estado excitado). A emissão de luz do decaimento de *NO₂ do estado excitado para o estado fundamental é proporcional à quantidade de NOx e portanto utilizado para quantificar NO. Esse procedimento detecta NO derivado tanto de nitrito quanto de nitrato, e também de nitrosotióis.

3.3 Western Blotting

Obtenção do extrato de proteínas totais – Os experimentos foram realizados em placas P100. O plaqueamento foi feito com 1 000 000 de células por placa, as placas foram mantidas por 24 h em meio de cultura DMEM com SFB para aderirem. Posteriormente, foram submetidas aos tratamentos por 48 h em condições de restrição de soro e adição de inibidor da NOS (L-NMMA à 500 µM) e rapamicina (150 nM).

As células foram lisadas em tampão de lise A (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 1% Triton X- 100, 1% SDS e inibidores de

proteases/fosfatases: aprotinina, leupeptina, NAPyr e NAF). As amostras de lisados totais de proteína foram armazenadas por 24h à -80°C.

Obtenção do extrato de proteínas citoplasmática para a análise da via PI3K/Akt/mTOR- Após descongelamento, o lisado foi centrifugado à 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante, fração citoplasmática, foi recolhido e o precipitado descartado. As proteínas dos extratos totais, foram dosadas para obter-se 50µg de proteínas com maior exatidão e, então, foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose ou PVDF. Antes da incubação overnight com anticorpo primário da proteína específica, a membrana foi incubada por 1 hora e 30 minutos com bloqueio de 5% de BSA ou leite em TBS-T pH 7,4 (o tipo de bloqueio varia conforme o anticorpo utilizado, portanto, a bula do anticorpo foi consultada). Foram utilizados anticorpos para PI3K #4249, p-Akt #2968, Akt #9272, mTOR #2972, p-mTOR #5536, rictor #2114, p-rictor #3806 e raptor #2280 (Cell Signaling Technology, EUA).

Após a incubação overnight à 4°C, a membrana foi lavada com TBS-T pH 7,4 e, em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário conjugado com HRP diluído em TBS-T por 1 hora. As membranas foram lavadas e incubadas com SuperSignal (Thermo) por 1 min para a detecção das bandas no fotovídeo documentador LAS 4000 (Fuji Film). As densidades das bandas serão medidas para análise dos dados.

4- Resultados e Discussão

4.1 Determinação dos níveis de NO produzidos pelas células na ausência e na presença de nutrientes.

A análise foi feita utilizando-se o equipamento Nitric Oxide Analyzer e o detalhamento dos procedimentos para obtenção dos resultados está descrito na sessão Material e métodos.

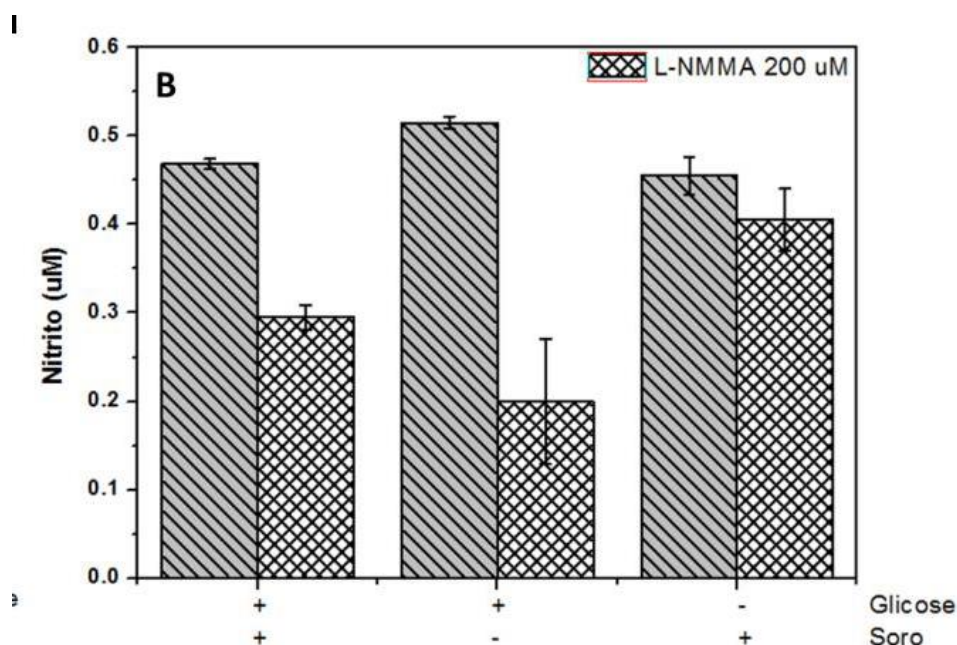
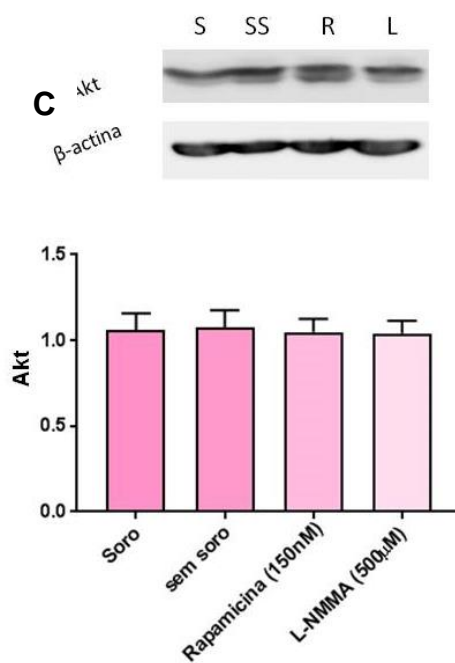
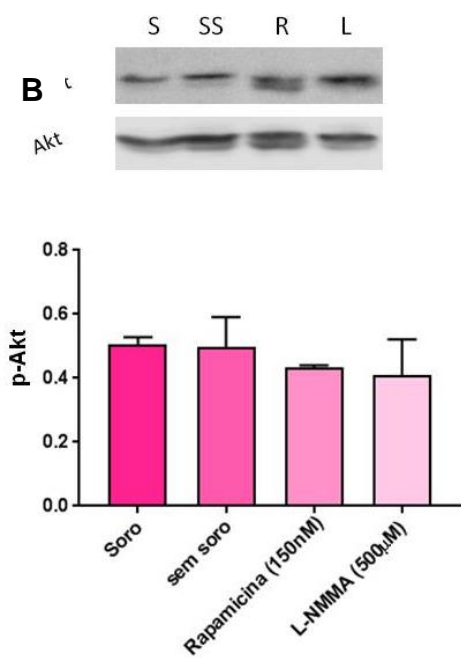
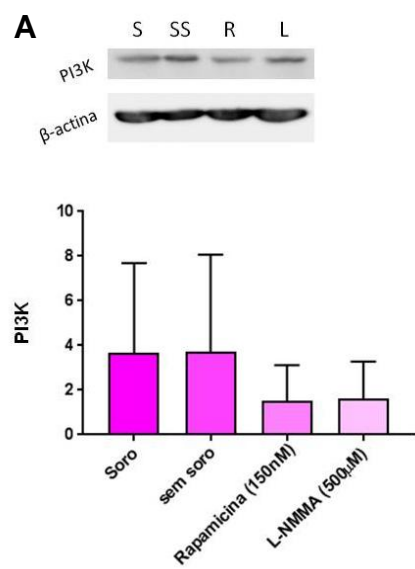


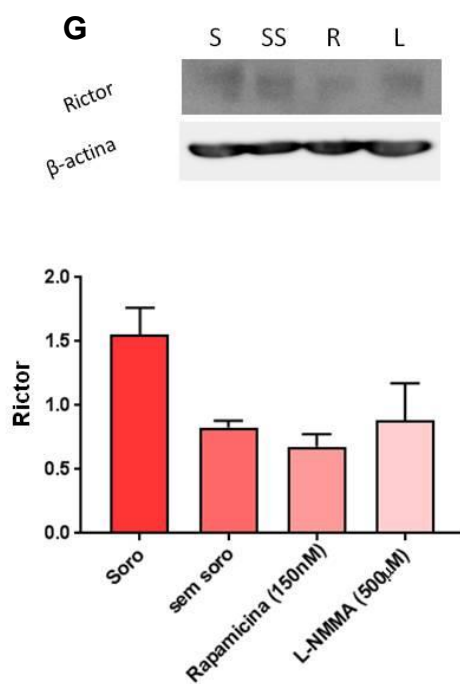
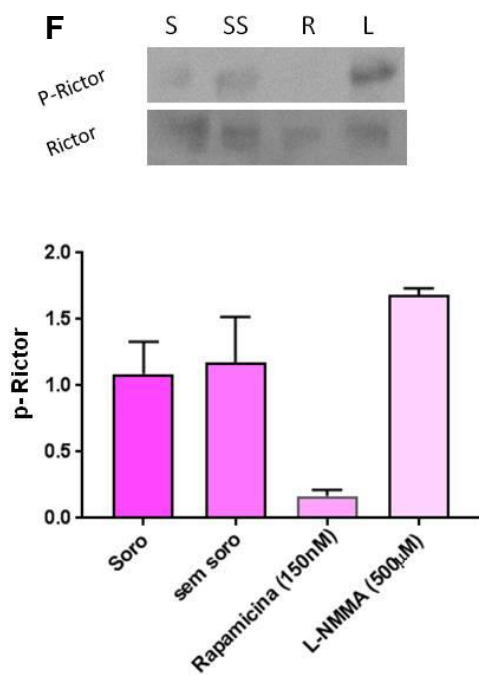
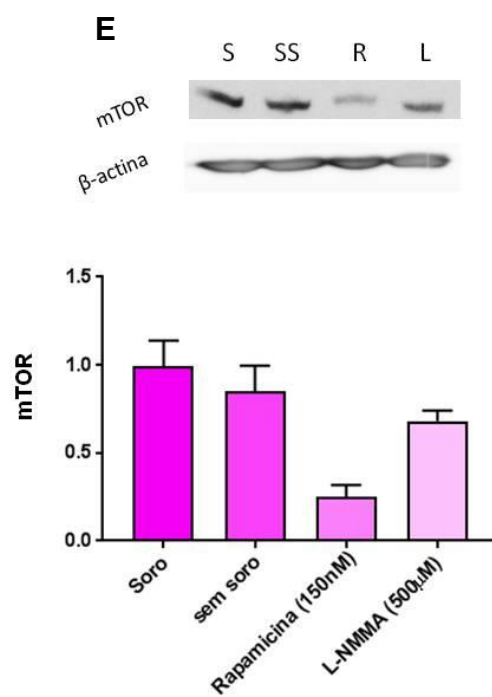
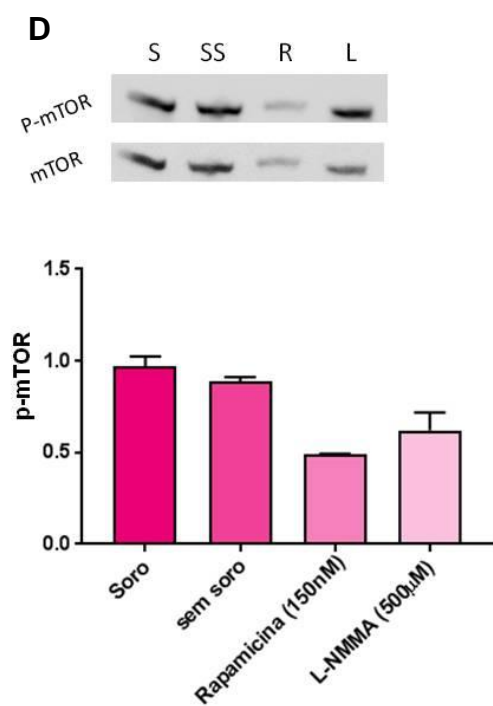
Figura 8. Quantificação da produção de NO. O nitrito foi quantificado no sobrenadante das células MDA-MB-231, quando estas células foram mantidas na presença ou ausência de soro ou glicose por 48 hs e na presença ou ausência do inibidor geral das NOSs L-NMMA.

Estes experimentos foram realizados pela pós-doutoranda Dra. Rita Tokikawa e acompanhados por mim. Os resultados revelam que a restrição de nutrientes por 48 hs promoveu uma elevação na produção de NO pelas células MDA-MB-231. Esta produção de NO era inibida pela incubação das células com L-NMMA, o inibidor geral das NOS.

4.2 Análise por Western Blotting das proteínas constituintes da via PI3K/Akt/mTOR

As proteínas PI3K, Akt, mTOR e as proteínas Rictor e Raptor tiveram seus níveis de expressão e de fosforilação analisados pela técnica de western blotting conforme detalhamento na seção Materiais e Métodos





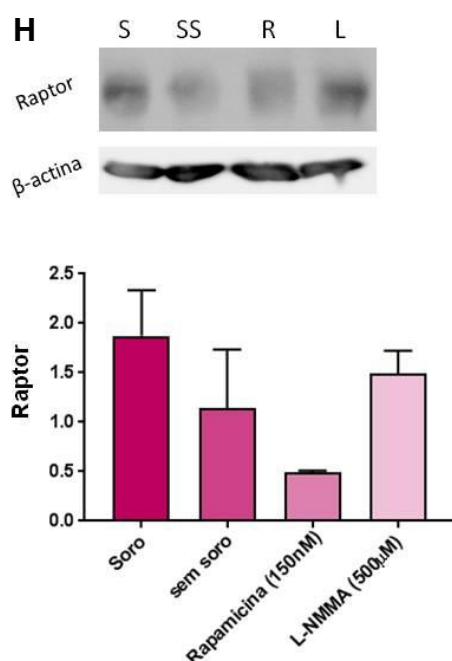


Figura 9 – As imagens de **A** à **H** representam qualitativamente e quantitativamente os níveis de expressão de proteínas totais e fosforiladas representantes da via PI3K/Akt/mTOR.

Com o desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso foi analisado o comportamento da via em questão sob condições de inibição das atividades enzimáticas da mTOR e da iNOS.

Os resultados apresentados dizem respeito às análises por western blot de cinco proteínas da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Analisou-se as proteínas: PI3K, Akt, m-TOR, Rictor e Raptor em células MDA-MB-231 que foram mantidas em meio livre de SFB pré-incubadas na ausência e na presença de rapamicina na concentração de 150 nM ou na ausência e presença do inibidor geral das NOS, L-NMMA na concentração de 500 μ M. Como um controle positivo mostramos os níveis de expressão e fosforilação

das cinco proteínas nas células mantidas em meio suplementado com 10% SFB.

Os resultados mostrados nas Figuras 9A sugerem que na ausência de SFB, as células que foram tratadas com rapamicina ou com L-NMMA apresentaram níveis menores de expressão da proteína quinase PI3K.

Nas Figuras 9B e 9C pode-se constatar que os tratamentos não alteraram significativamente os níveis de fosforilação e de expressão da proteína quinase Akt.

Os resultados apresentados nas Figuras 9D e 9E revelam que os níveis de fosforilação e expressão da mTOR estão diminuídos após tratamento prolongado com rapamicina e com L-NMMA.

Nas Figuras 9F e 9G observa-se uma diminuição radical dos níveis de fosforilação da proteína Rictor após o tratamento com rapamicina. Um resultado muito interessante, por outro lado, foi obtido para as células que foram pré-incubadas com o inibidor das NOSs. Os níveis de fosforilação da proteína Rictor, se elevaram após inibição da produção endógena de NO nas células. O mesmo aconteceu para os níveis de expressão da proteína Raptor (Figura 9H).

O radical livre NO participa diretamente e indiretamente da modificação pós-tradução de proteínas sinalizadoras. Indiretamente ele modula a fosforilação e desfosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina destas proteínas. Diretamente ele modifica estas proteínas sinalizadoras através da s-nitrosilação do aminoácido cisteína (Monteiro et al., 1994; Caselli et al., 1994; Lander et al., 1996; Hess et al., 2006).

Espécies reativas no geral e em particular do NO possuem um papel importante na carcinogênese uma vez que modificam diretamente proteínas participantes do ciclo celular, apoptose e reparo do material genético (Hess et al., 2006); O NO gerado endógenamente a partir da manutenção das células MDA-MB-231 sob restrição de nutrientes, pode ser um indutor da via de sobrevivência e proliferação PI3K/Akt/mTOR, nestas células (Monteiro et al., 2008).

O câncer de mama do tipo triplo-negativo foi caracterizado, segundo o INCA, como o subtipo de pior prognóstico, isso pode estar relacionado à super

expressão e ou atividade da enzima iNOS que promove um aumento na atividade de mTOR. Desta forma ocorreria uma super ativação da via PI3K/Akt/mTOR, resultando na progressão do câncer (Esther L et al.,2014; Yuan, T L., 2008, revisado por Zoncu, R., 2011).

5- Conclusão

O uso de rapamicina, por inibir a fosforilação da m-TOR, atua sobre os dois complexos de sinalização resultantes da ativação desta proteína, mTORC1 e mTORC2, dos quais fazem parte as proteínas Raptor e Rictor, respectivamente. Os resultados publicados anteriormente por outros grupos de pesquisa mostraram que a rapamicina era eficiente ao inibir a proliferação das células tumorais atuando no elemento central da via de sinalização (FOSTER, K. G. et al., 2010).

Nossos resultados também sugerem que o NO produzido endógenamente pelas células MDA-MB-231 mantidas sob restrição de nutrientes, também atua sobre a via, particularmente sobre as proteínas Raptor e Rictor.

6- Referências bibliográficas

AGARWAL R. *et al.* Integrative analysis of cyclin protein levels identifies cyclin b1 as a classifier and predictor of outcomes in breast cancer. Clin Cancer Res. 2009. V.15. 3654 –3662p.

AMBS, S.; GLYNN S. Candidate pathways linking inducible nitric oxide synthase to a basal-like transcription pattern and tumor progression in human breast cancer. Cell Cycle, 2011. v.10. 619–624 p.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em :
<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html> Acessado em:
 09/03/2018

AYLETT, C. H. S. *et al.* Architecture of human mTOR complex 1. Science, 2016. v. 351. 48-52 p.

BASUDHAR D,*et al.* Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression. Antioxid Redox Signal. 2017 v. 26 1044-1058

BATISTA, W. *et al.* S-nitrosoglutathione and endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulate compartmentalized Ras S-nitrosylation and stimulate cell proliferation. Antioxid Redox Signal, 2013. v.18. 221 p.

BAUER, K. R. Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype. American Cancer Society, 2007. v.109(9). 1721-1728 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.html Acessado em: 25/06/2018

CHRISTINE L. *et al.*, A Perspective on Cancer Cell Metastasis. Science. 2011. v. 331. 1559-1564 p.

CLOUGHESY, T. F. *et al.* Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. PLoS Med. 2008. v.5.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. A célula, uma abordagem molecular. 3ªed. Artmed, 2007.

DAWOOD S., *et al.* Survival among women with triple receptor negative breast cancer and brain metastases. Ann Oncol. 2009. v. 20. 621– 627 p.

DE OLIVEIRA, G.A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in the carcinogenesis of gastrointestinal cancers. Antiox Redox Signal, 2017. v.26. 1059-1077 p.

DENT, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 2007. v.13. 4429–4434 p.

DIMMELER, S. *et al.* Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1997. v.1(4). 275-281 p.

FAIVRE, S. *et al.* Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.*, 2006. v.5(8). 671 p.

FOSTER, K. G. *et al.* Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.*, 2010. v. 285. 14071– 14077 p.

FÖRSTERMANN U. E SESSA W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012. V. 33. 829-837 p.

GARRIDO P., *et al.* Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017. V. 8(46). 80568-80588 p.

GHELDOLF A. E BERX. G., Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. [Prog Mol Biol Transl Sci](#). 2013. v.116. 317-336 p.

GIERACH, L. G.*et al.* Epidemiology of triple negative breast cancers. *Breast Dis.*, 2010. v.32(0). 5-24 p.

GLYNN, S. A. *et al.* Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *J. Clin. Invest.*, 2010. v. 120. 3843p.

GRANADOS-PRINCIPAL, S. *et al.* Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015. v.17(1). 25 p.

GRANN, V. R. *et al.* Hormone Receptor Status and Survival in a Population-Based Cohort of Patients with Breast Carcinoma. *American Cancer Society*, 2005. v. 103. 2241-2251 p.

GULHATI, P. *et al.* mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal câncer via RhoA and Rac1 signalling pathways. *Cancer research*, 2011. v. 71(9). 3246-3256 p.

HUANG, G. L. *et al.* Clinical significance of mir-21 expression in breast cancer: Sybr-green i-based real-time rt-pcr study of invasive ductal carcinoma. *Oncology Reports*, 2009. v.21. 673–679 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>. Acesso em: 03/05/2018

INTERANTIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Organização Mundial da Saúde. 2014.

KEMLER, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends in Genetics*, 1993. v.9(9). 317-321 p.

LECHNER, M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*, 2005. v.15(4). 277-289 p.

LEITE, T.Y. Papel da mTOR e iNOS sobre a viabilidade da célula tumoral de cólon. Relatório Final de Atividades. Proc. FAPESP: 2014/08523-5

LITVAK, K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. v. 25(4). 402-408 p.

LIVASY C.A., *et al.* Phenotypic evaluation of the basallike subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006. V.19. 264 – 271p.

MARTÍNEZ-REVOLLAR, G. *et al.*, Heterogeneity between triple negative breast cancer cells due to differential activation of Wnt and PI3K/AKT pathways. *Exp Cell Res*, 2015. v.339(1). 67-80 p.

MILLIKAN R.C., *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008. v. 109. 123–139 p.

MONTEIRO, H. P. *et al.* Nitric Oxide: protein tyrosine phosphorylation and protein S-nitrosylation in cancer. *Biomedical Journal*, 2015. v.38(5). 380 p.

MOYANO J.V., *et al.* AlphaB-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Clin Invest*. 2006. V. 116. 261–270 p.

NAGARAJA, G. M. *et al.* Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics. *Oncogene*, 2005. v.25(16). 2328 p.

ONITILO, A. A. *et al.* Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clinical Medicine & Research*, 2009. v.7. 4-13 p.

PUGLISE, M.A. *et al.* High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *J. Pathol.*, 2015. v.236. 479-490 p.

ROWE, R. G. *et al.* Breaching the basement membrane: who, when and how?, *Cell Press*, 2008. v.18(11). 560-574 p.

SETH, D. *et al.* The SNO-proteome: Causation and classification. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011. v.15(1). 129-136 p.

SWITZER, C. H. *et al.* S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer. *Mol Cancer Res*, 2012 v. 10(9). 1203-1215 p.

TAVARES A.C., *et. Al.* Detailing Peripheral Arterial Tonometry in Heart Failure. An Endothelial Function Evaluation. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 2017. V.30. 2359-2364 p.

TEPASS, U. *et al.* Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2000. v.1(2). 91 p.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature*, 2001. v.2(6). 442-454 p.

THOMAS DD, WINK DA. NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Jun 10;26(17):963-96

TOFT D. J. E CRYNS V. L. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. [Mol Endocrinol](#). 2011. v.25(2). 199-211 p.

VODUC D., *et. Al.* The combination of high cyclin E and Skp2 expression in breast cancer is associated with a poor prognosis and the basal phenotype. *Hum Pathol*. 2008. v. 39. 1431–1437 p.

WEINBERG, R. A. *The biology of cancer* by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007.

WILLIAMS J. L. *et al.* Protein nitration and nitrosylation by NOdonating aspirin in colon cancer cells: Relevance to its mechanism of action. *Exp. Cell Res. Experimental Cell Research*, 2012. v. 318.

YAN, L. X., *et al.* Microrna mir-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*, 2008. v. 14. 2348–2360 p.

YANG X.R., *et. al.* Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2007. v. 16. 439 – 443 p.

YUAN, T. L.; CANTLEY, L C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 2008. v. 27. 5497–5510 p.

ZONCU, R. *et al.* mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2011. v. 12. 21–35 p.